



日本学術振興会・产学協力委員会

R022 **量子構造生物学委員会**

第8回 研究会 資料

2022年12月19日（月）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）
(ハイブリッド形式で開催)

R022 量子構造生物学委員会 第8回研究会 プログラム

2022年12月19日（月）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F
(ハイブリッド形式で開催)

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:35 – 14:35 （講演1）

司会：委員長・三木邦夫（京都大学）

デジタルバイオ分析法から人工細胞リアクタ工学

東京大学・大学院工学系研究科
野 地 博 行

14:35 – 15:00 休憩

15:00 – 16:00 （講演2）

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

受容体構造生物学から創薬へ～LassoGraft Technologyと受容体作動薬の開発～

大阪大学・蛋白質研究所
高 木 淳 一

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

デジタルバイオ分析法から人工細胞リアクタ工学

From Digital Bioassay toward Artificial Cell Reactor Technology

東京大学 工学系研究科 応用化学専攻

野 地 博 行

Hiroyuki Noji

Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo

ABSTRACT

我々は大きさ μm で体積がフェムトリットル($f\text{L}=10^{-15}\text{L}$)サイズのリアクタが並んだアレイ技術「フェムトリアクタ技術」を開発し、1分子単位の酵素アッセイに基づくデジタルバイオ分析法を開発してきた。この手法を発展・応用することによって抗原抗体反応を含めて多くの種類のバイオアッセイを1分子デジタル化することに成功した。一方、我々の技術を含めこれまでのフェムトリアクタは検出・計測する分子を受動的に捕捉するだけであった。そこで、これまでのデジタルバイオ分析法のプラットフォーム技術を刷新することを目的に、動的フェムトリアクタ技術の開発に取り組んでいる。具体的には、特定分子を濃縮もしくは排出する機能、外部からの刺激を演算する機能、内部反応によつて自己成長する機能などである。本発表では、これまでに成果の出ている分子濃縮能を有するフェムトリアクタ技術及び、自己成長する機能を有するフェムトリアクタ技術について紹介したい。この研究の一つの究極的な目標は、自律的に分裂する人工細胞システムの創出である。未だ遠く及ばないが、それに向けた取り組みについても時間があれば紹介したい。

INTRODUCTION

これまで、マイクロリアクタ技術に基づいて1細胞単位のゲノミクス・ランスクリプトーム解析などさまざまな革新的バイオ分析技術が開発してきた。その多くで用いられるマイクロリアクタは water-in-oil ドロプレットで、その

サイズは直径 $10\text{-}100 \mu\text{m}$ 、体積はナノからピコリットル ($\text{nL-pL}=10^{-9\text{-}12}\text{L}$) が一般的である。ここからサイズをさらに $1/10$ 以下にすると体積はフェムトリックトル ($\text{fL}=10^{-15}\text{L}$) レベルとなり、酵素 1 分子の反応に由来する信号を高い精度で検出することができる。我々は、この考えに基づき PDMS 素材のフェムトリアクタを開発し、fluorogenic 基質と混ぜるだけで簡単に β -galactosidase 及び horseradish peroxidase の 1 分子デジタルバイオアッセイが可能であることを実証した [1]。その後、より簡便な操作で 10^6 個を超える数のフェムトリアクタを並べる技術を開発し [2]、現在まで我々のグループにおける標準的な技術となっている。その後、我々のグループ以外でもフェムトリアクタ技術が報告されている。デジタルバイオ分析法の研究動向に関する詳細は我々の最近の総説 [3]を参照されたい。

通常のデジタルバイオ分析法では、水溶性の酵素もしくは酵素で標識された抗体等を封入するが、それ以外の生体分子や分子システムの封入・再構成も可能となっている。例えば、フェムトリアクタの開口部を脂質二重膜で封することで、そこに再構成した膜タンパク質の輸送活性の 1 分子計測も可能である [4,5,6]。また、フェムトリアクタに無細胞遺伝子発現系を導入することで、1 分子の DNA からの転写・翻訳活性を定量的に計測する系を開発した。この系を利用することで、高精度の酵素スクリーニング技術を開発し、alkaline phosphatase の活性を 10 倍以上に向上させることにも成功している [7]。

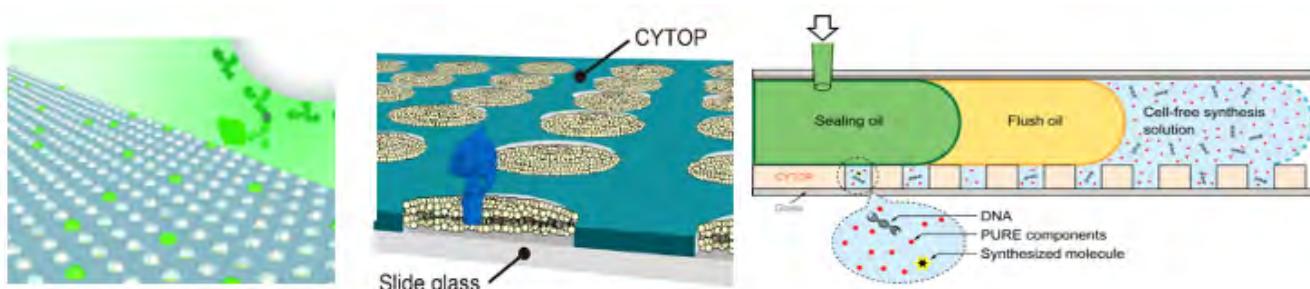


Fig. 1. Digital bioassays and relevant assays. Schematic images of digital ELISA (left), digital transporter assay with arrayed lipid bilayer chamber system, ALBiC (middle), and enzyme screening system based on digital gene expression (right)

ATPS-BASED ON-CHIP ENRICHMENT

このように、フェムトリアクタを用いることでさまざまなデジタルバイオ分析法が開発されたが、これまでのリアクタは受動的に分子を封入するのみであった。我々はリアクタそのものにさまざまな能動的機能を付加することで、次世代のデジタルバイオ分析法やその応用技術を開発することを目指している。その一つの方向として、液液相分離現象をデバイス技術に利用した技術開発を行なっている。現在、生体分子による biological droplet が非常に注目を浴びているが、我々が現在まで主として用いているのは化学的に非常に不活性なポリマーである dextran (DEX) と polyethylene glycol (PEG) からなる aqueous two phase system (ATPS) ドロプレット (DEX/PEG ATPS droplet) である。その理由は、通常の biological droplet と異なり、DEX 及び PEG には電荷や芳香環がないため、他の生化学反応との適合性が高いという考えに基づいている。

我々は、DEX/PEG ATPS をフェムトリアクタと融合したデバイス技術を開発した。Fig 2 にある通り、このシステムではフェムトリアクに DEX-rich droplet が充填されている。その上部は PEG-rich 溶液が存在しており、この二つの液相の間は低分子が自由に拡散できる。一方、DNA や RNA そしてある種のタンパク質は、優先的に DEX-rich droplet に分配されることがわかっている。それらの分子にとっては、DEX-rich droplet は閉鎖系となる。この特徴を利用してことで、PEG-rich 相から DEX-rich droplet へ能動的に分子を濃縮することができる。また、通常は DEX 相に濃縮されないようなタンパク質でも、DEX と結合するタンパク質との遺伝的融合や、DEX 相に濃縮する改変型抗体分子を用い

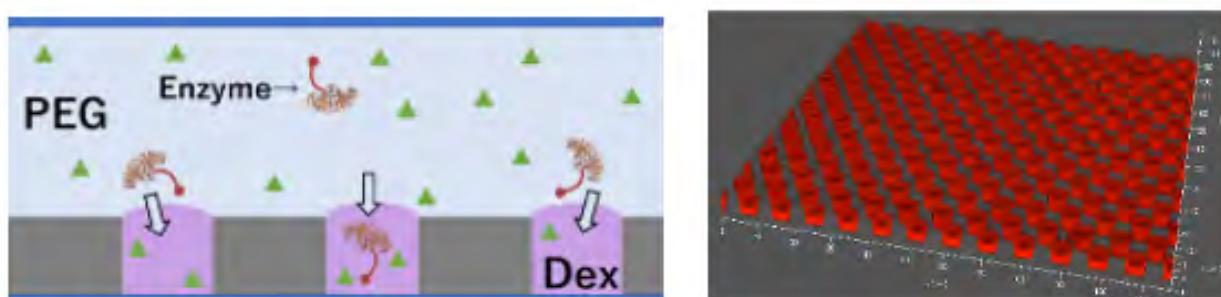


Fig. 2. On-chip enrichment system based on DEX/PEG ATPS. Schematic images of enrichment (left), and fluorescent image of DEX-rich droplets displayed on femto-reactor device (right)

ることで、DEX-rich droplet に高効率に濃縮することができる。このオンチップ分子濃縮技術とデジタルバイ分析法を組み合わせることで、Cas13 による 1 分子 RNA 検出や抗原タンパク質の超高感度化に成功している。

ATPS-BASED ARTIFICIAL CELL REACTOR SYSTEM

上述の研究の過程で、我々は DEX/PEG ATPS における新しい知見を見出した。それは、溶液中の DNA や RNA によって DEX/PEG ATPS が安定化されるという現象である。これまで、DEX/PEG ATPS の DEX-rich 相に DNA や RNA が濃縮されることは報告されているが、その逆の効果である DNA や RNA による相分離状態の安定化は報告されていなかった。我々は、この現象を利用することで自己成長するリアクタシステムの開発に取り組んでいる。すなわち、DEX-rich droplet に DNA 複製系を再構成することで、内部の DNA 増幅に伴って DEX-rich droplet が成長するというものである。現在までに、DEX-rich droplet を格納したフェムトリアクタ中で DNA 増幅反応を行うことで、リアクタから DEX-rich droplet が突出する現象を確認するに至っている。この様な DEX-rich droplet に DNA 合成酵素をエンコードした DNA 及び無細胞遺伝子発現系を再構成することで、遺伝子発現に伴って自己成長を行うリアクタの開発にも成功している。今後、自律的な細胞分裂能を与えることができれば、人工的な環境で自律進化する人工細胞の創出が可能となる。このような人工細胞研究からは、各種の生化学反応を微小空間に再構成・集積化する技術も生み出される。それらを効果的に統合することでさまざまなオンチップ無細胞システムが実現し、バイオデバイス技術を刷新することも期待できるだろう。

ACKNOWLEDGEMENTS

本研究は、JSPS 基盤(S) (JP19H05624)及び JST CREST (JPMJCR19S4)などの援助を受け実施した。

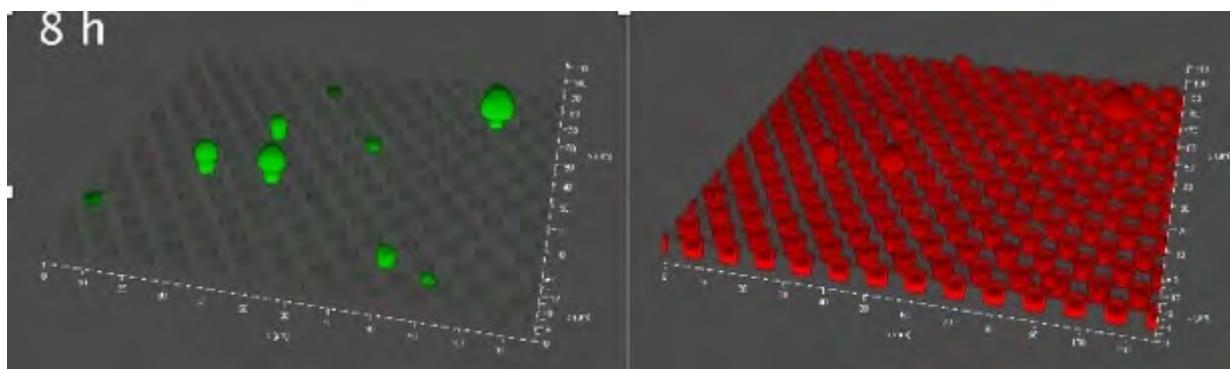


Fig. 3. Artificial cell reactor with self-growing activity. Fluorescent images of amplified DNA (left), and DEX-rich droplet (right), after 8 hr incubation

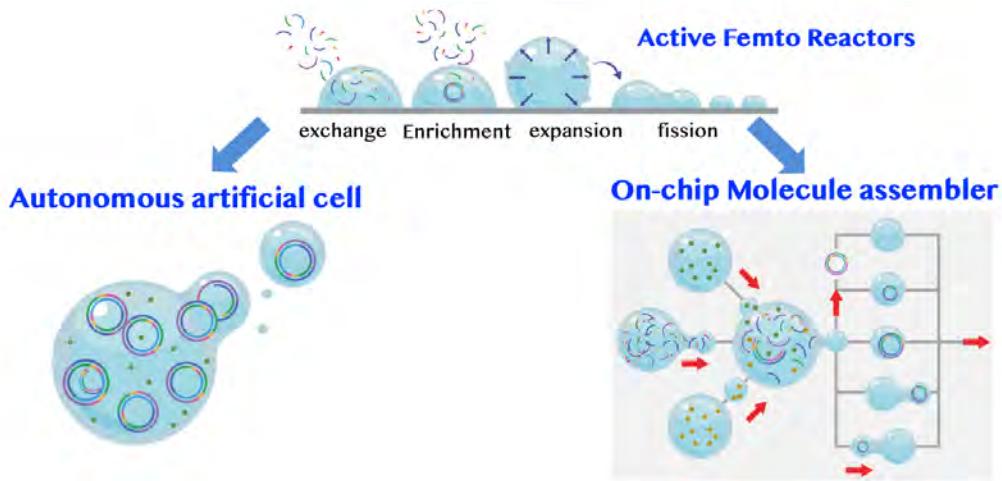


Fig. 4. Perspectives of active femto reactor technology (top) for autonomous artificial cell (left) and on-chip cell-free systems such as DNA assembler or protein printers (right)

-
1. Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi and H. Noji, *Nat Biotechnol*, 2005, **23**, 361-365.
 2. S. Sakakihara, S. Araki, R. Iino and H. Noji, *Lab Chip*, 2010, **10**, 3355-3362.
 3. H. Noji, Y. Minagawa and H. Ueno, *Lab Chip*, 2022, **22**, 3092-3109.
 4. R. Watanabe, N. Soga, D. Fujita, K. V. Tabata, L. Yamauchi, S. Hyeon Kim, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, H. Suga and H. Noji, *Nat Commun*, 2014, **5**, 4519.
 5. N. Soga, R. Watanabe and H. Noji, *Sci Rep*, 2015, **5**, 11025.
 6. R. Watanabe, T. Sakuragi, H. Noji and S. Nagata, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, **115**, 3066-3071.
 7. Y. Zhang, Y. Minagawa, H. Kizoe, K. Miyazaki, R. Iino, H. Ueno, K. V. Tabata, Y. Shimane and H. Noji, *Sci Adv*, 2019, **5**, eaav8185.

受容体構造生物学から創薬へ
～LassoGraft Technology と受容体作動薬の開発～

Developing Artificial Receptor Agonists by Using LassoGraft Technology®

大阪大学 蛋白質研究所

高木 淳一

Junichi Takagi

Institute for Protein Research, Osaka University

私たちの体を構成する細胞は様々なコンテクストにおいて多様なシグナルを細胞の外で受容し、受容したことの信号(シグナル)は細胞内へと伝達され、様々な生物学的反応が起こる。例えば、増殖因子はレセプターに受容されると細胞内でキナーゼカスケードを動員して必要な因子の転写を開始し、神経ガイダンス分子はレセプターに受容されると細胞骨格系の修飾により細胞移動を制御して複雑な神経回路網を形成する。これらの「シグナル伝達」においては、ホルモンやサイトカインなどのリガンド分子が細胞膜上で受容体を多量体化（多くの場合2量体化）することによって引き起こされることが多い。ただしそれには、単純に2つの受容体分子を膜上で引き寄せれば良いのではなく、「正しい距離と配向で」引き寄せられた、いわゆる「シグナル伝達型コンフォーメーション」の多量体形成が必要であることが、様々な受容体－リガンド複合体の立体構造解析から明らかになってきている（図1）[1]。これは逆に言えば、受容体を“正しく”2量体化させる人工分子が作れれば、それは天然のリガンドと全く異なる分子でありながらも同じ生理活性をもつ、人工作動薬（アゴニスト）となることが期待される。われわれは、 10^{13} にも達する多様性をもつライブラリーから医薬候補化合物となる特殊環状ペプチドを超迅速に探索する RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) 法をディスカバリーフェーズに用い、得られたペプチド配列を投げ縄（ラッソ）状にして、立体構造を考慮した蛋白質工学によって既存の蛋白質に埋め込む（グラフト）というアイデアを着想し、LassoGraft Technology®（以下 LG 法と略記）の開発に至った [2]。この方法を用いれば、

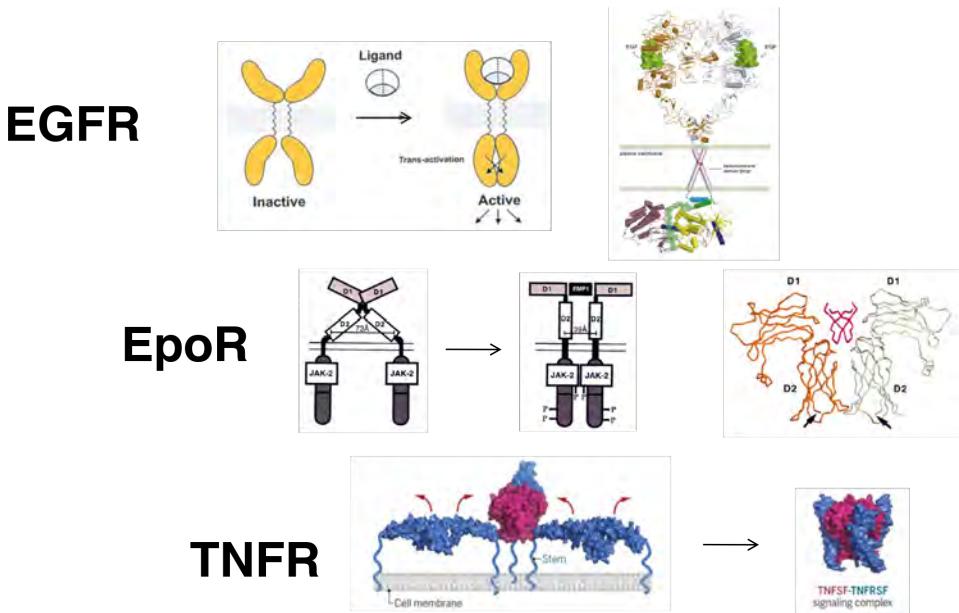


図 1. 立体構造解析から解明された受容体多量体化による活性化機構

抗体に限らない様々な蛋白質に、様々な創薬ターゲットに対する結合性を持たせた人工蛋白質(グラフト体)を極めて高い成功率で創り出すことが可能である。これを抗体の Fc 領域に応用することで、極めて簡単かつシステムティックに様々な受容体に対する人工アゴニストを創成できることが明らかになってきた。

一般に環状ペプチドは、標的蛋白質に対して非常に高い特異性と親和性を併せ持つために、医薬リード化合物として極めて高いポテンシャルを持っている。もし環状ペプチドからその重要なファーマコフォアだけを抽出してそれをヒトの天然蛋白質に組み込むことができれば、環状ペプチドと蛋白質の両方のメリットを兼ね備えた、より有用性の高いバイオ医薬モダリティを生み出すことができる。RaPID 法によって得られる環状ペプチドはチオエーテル結合によって環化されており、十数残基のペプチド部分が折れたたまって“活性構造”を取って標的蛋白質に結合するため [3]、この活性構造が維持されるように土台となる蛋白質に融合させれば、ペプチドの結合活性を土台蛋白質に賦与できるはずである（図 2）。そこで、蛋白質表面に露出したループの中間点、とくにその両側に安定な二次構造が存在して両端を近接させる効果が大きそうな部位（たとえば β ヘアピンループ）に RaPID ペプチド配列を挿入したグラフト体を作製することにした。土台として選んだのは抗体 IgG の定常ドメインである Fc である（図

3)。8箇所の β ヘアピン部分(図3の球で示したところ)にペプチド配列を挿入すると、Fcは重鎖のCH2-CH3領域がホモ2量体化した蛋白質であるため、Fcグラフト体は自動的に2カ所のペプチド部分を提示する2価の分子となる。神経ガイダンス因子Semaphorin 4D(Sema4D)の受容体であるPlexin B1(PlxnB1)に結合する環状ペプチドm6A9[4,5]の内部配列を挿入したFc蛋白質を合計8種類作製したところ、全てがペプチド挿入無しのFcと同等の効率で細胞から分泌され、しかもPlxnB1固定化ビーズに等しく結合し、環状ペプチドの結合活性がFc蛋白質に移植できたことがわかった。

同じ事をまったく異なる配列を持つaMD4ペプチド(肝細胞増殖因子(HGF)受容体であるMET結合性の環状ペプチド)[6]でおこなっても同様であるので、この性質は特定のペプチド配列や特定の標的分子に依存しない。さらに土台蛋白質としてはFcに限らず、ヒト成長因子やヒト血清アルブミン、アルカリリフォスファターゼなど、ほとんどどんな蛋白質でも適合することが示された[2]。

抗体の最も重要な機能は言うまでもなく特定の抗原を高い特異性で認識することであり、それはFab領域が担うが、抗体がバイオ医薬の主要なモダリティとして不動の地位を占めている大きな理由の一つはその優れた血中動態と生体適合性、そして各種の免疫エフェクター活性にあり、これらの性質は全てFc領

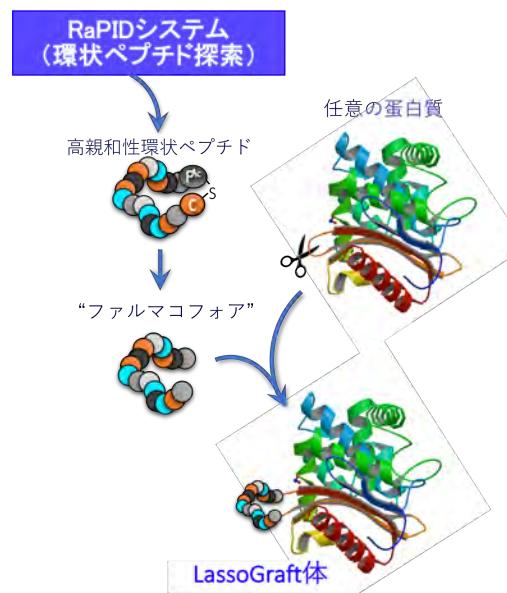


図2. LassoGraft法の原理

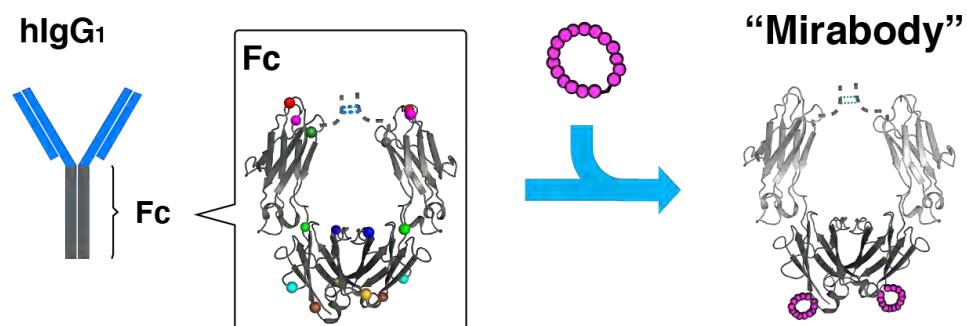


図3. Fcを土台にLG法を応用して出来る“Mirabody”

域に起因している [7]。LG 法により標的結合活性を賦与された Fc は、いわば Fab を持たない今まで IgG 抗体の重要な機能（すなわち抗原結合性と各種 Fc 受容体結合活性）をすべて備えた分子である。実際に、8 力所のなかのどこにペプチドをグラフトした Fc でも、その血中寿命を左右する胎児性 Fc 受容体 (FcRn) や IgG の精製に用いられる Protein A などに対する結合能はもとの Fc と同様であることを確認しており [8]、ADCC 活性をなう NK 細胞受容体 (FcgrII など) に対する結合も一部のグラフト部位を除いてインタクトである。これは抗体と同じ機能を、抗体の 1/3 の分子量（約 5 万）の単一サブユニットの蛋白質 (IgG と違って重鎖のみ) に持たせられるという事である。我々はこの「RaPID ペプチドをグラフトした Fc 蛋白質」を Mirabody® と総称することにして、すでに何十種類もの受容体に対して普通の IgG 抗体と同様に様々な用途（免疫沈降、FACS、機能阻害など）に使える Mirabody を取りそろえるに至っている（図 3）。ところが Mirabody というモダリティは、我々も当初予測していなかった機能的有用性を持つことがやがて明らかになった。それは“受容体アゴニスト”という性質である。

たとえば我々は、PlxnB1 に結合する m7 ペプチド（前述の m6A9 ペプチドとは別の RaPID ペプチド）をグラフトした Mirabody が、細胞上の PlxnB1 を活性化して細胞の形態変化を引き起こす、すなわち PlxnB1 のアゴニスト（作動薬）として挙動することを見いたした [9]。興味深いのは、m7-Mirabody がすべてアゴニストになるわけでは無く、8 種類のグラフト体のうちある特定のものがこの活性を持つということである。PlxnB1 はその生理的リガンドである Sema4D が結合すると face-to-face と呼ばれる特殊な形の 2 量体化が引き起こされ、細胞内にある GAP ドメインが活性化してシグナルを伝えることが知られている（図 4 左）。じつは m7-Mirabody のうち最もアゴニスト活性の高い B2 サイトのグラフト体は、2 つの m7 ペプチド部分で細胞上の 2 つの PlxnB1 分子に結合して引き寄せ、まさにこの face-to-face ダイマーを形成させるということが、構造解析の結果から示唆された（図 4 右）。つまり、m7-Mirabody (B2) は PlxnB1 を細胞外領域で架橋し、細胞内の GAP 活性化を引き起こすための構

造的な必要十分条件を満たす人工蛋白質であったのだ。この「受容体を細胞上で特定の距離と配向で2量体化する」というのは多くのシグナリング受容体の活性化メカニズムとして普遍的に見られるものであることから、受

容体の様々な部位に結合する RaPID ペプチドを揃えておき、これを Fc 中に8力所あるグラフト部位に提示させた様々な Mirabody パネルを網羅的に調べる事により、極めてシステムティックに受容体アゴニストを創製できる可能性が高い。事実我々は、すでに MET を始め複数の受容体を活性化できるアゴニスト性 Mirabody の開発に成功している [8]。細胞上で受容体を2量体化するだけなら通常の抗体でも出来そうなのだが、抗受容体抗体の中でアゴニスト作用を持つものはそれほど多くは無い。これは、Fab アームがフレキシブルな IgG では、「特定の方向と距離で」受容体を2量体化するには適していないことが一つの理由と考えられる [10]。Mirabody が Fc という rigid な土台を有していることが、特定の二量化コンフォーメーションを誘導して受容体を活性化させる目的には適していると考えられる。

我々は、標的分子に高い親和性を有する RaPID ペプチドの配列を蛋白質の分子表面に挿入する LG 法を開発したことで、抗体のように標的分子に特異的に結合する分子を迅速かつ自在に作製することを可能にした。そしてそれを Fc タンパク質に応用することで、血中半減期の長い、すなわちバイオ医薬として望ましい性質をもった人工受容体アゴニストを高効率で創成できることがわかった。これまで受容体を標的にしたバイオ医薬は、生理的リガンドの結合と競合してシグナル伝達を阻害するアンタゴニストという形を取ることがおおかつた。しかし、受容体シグナルを活性化する作動薬が望まれる疾患もたくさんある。たと

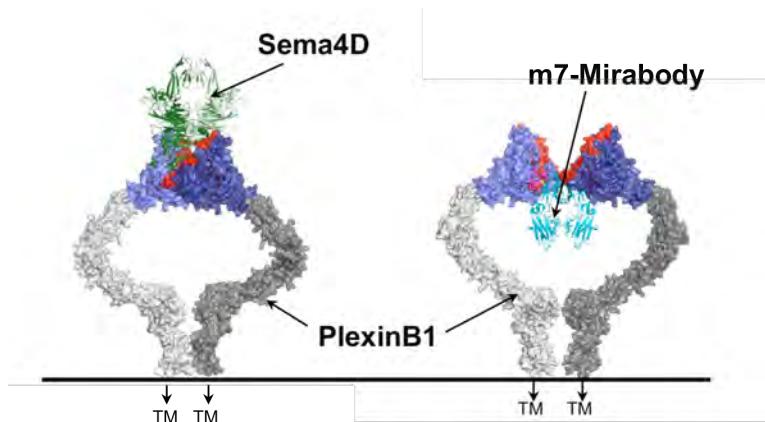


図 4. Sema4D と m7-Mirabody はともに細胞上で plexinB1 の「face-to-face」ダイマーを形成する

えば MET の活性化は肝細胞の増殖を促すため、線維化によって肝機能低下を引き起こす NASH（非アルコール性脂肪肝炎）の治療薬として有望である。LG 法という純国産の技術が、他の様々な先端的バイオ医薬技術と融合することで、これまで難しかった受容体作動薬の開発や、特定臓器や細胞にバイオ医薬を届ける普遍的で強力なターゲッティング技術へと発展していくことを夢見ている。

-
1. Chataigner, L.M.P., Leloup, N., and Janssen, B.J.C.; Structural Perspectives on Extracellular Recognition and Conformational Changes of Several Type-I Transmembrane Receptors. *Front Mol Biosci* **7**, 129 (2020).
 2. Mihara, E., Watanabe, S., Bashiruddin, N.K., Nakamura, N., Matoba, K., Sano, Y., Maini, R., Yin, Y., Sakai, K., Arimori, T., Matsumoto, K., Suga, H., and Takagi, J.; Lasso-grafting of macrocyclic peptide pharmacophores yields multi-functional proteins. *Nat Commun* **12**, 1543 (2021).
 3. H. Suga; Max-Bergmann award lecture:A RaPID way to discover bioactive nonstandard peptides assisted by the flexizyme and FIT systems. *J Pept Sci*, **24**, e3055 (2018).
 4. Bashiruddin, N.K., Hayashi, M., Nagano, M., Wu, Y., Matsunaga, Y., Takagi, J., Nakashima, T., and Suga, H.; Development of cyclic peptides with potent in vivo osteogenic activity through RaPID-based affinity maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 31070-31077 (2020).
 5. Matsunaga, Y., Bashiruddin, N.K., Kitago, Y., Takagi, J., and Suga, H.; Allosteric inhibition of a semaphorin 4d receptor plexin b1 by a high-affinity macrocyclic peptide. *Cell Chem Biol* **23**, 1341-1350 (2016).
 6. Ito, K., Sakai, K., Suzuki, Y., Ozawa, N., Hatta, T., Natsume, T., Matsumoto, K., and Suga, H.; Artificial human met agonists based on macrocycle scaffolds. *Nat Commun* **6**, 6373 (2015).
 7. H. I. Park, Yoon, H.W., and Jung, S. T.: The Highly Evolvable Antibody Fc Domain. *Trends Biotechnol* **34**, 895-908 (2016).
 8. Sakai K, Sugano-Nakamura N, Mihara E, Rojas-Chaverra NM, Watanabe S, Sato H, Imamura R, Chih-Cheng Voon D, Sakai I, Yamasaki C, Tateno C, Shibata M, Suga S, Takagi J, and Matsumoto K.; Designing receptor agonists with enhanced pharmacokinetics by grafting macrocyclic peptides into fragment crystallizable regions. *Nature Biomed Eng* Nov 7, AOP (2022).
 9. Sugano-Nakamura N, Matoba K, Hirose M, Bashiruddin NK, Matsunaga Y, Yamashita K, Hirata K, Yamamoto M, Arimori T, Suga H* and Takagi J*.; De

novo Fc-based receptor dimerizers differentially modulate PlexinB1 function.
Structure **30**, 1411-1423 (2022).

10. Orr, C.M., Fisher, H., Yu, X., Chan, C.H-T., Gao, Y., Duriez, P.J., Booth, S.G., Elliott, I., Inzhelevskaya, T., Mockridge, I., Penfold, C. A., Wagner, A., Glennie, M. J., White, A. L., Essex, J.W., Pearson, A.R., Cragg, M. S., Tews, I.; Hinge disulfides in human IgG2 CD40 antibodies modulate receptor signaling by regulation of conformation and flexibility. *Science Immunol.* **7**, eabm3723 (2022).